وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة البصرة _كلية الزراعة

قسم علوم الاغذية

انتاج حامض الستريك من عزلة فطرية محلية

اعداد الطالبة :

بيداء عبد الكريم عامر

المرحلة : الرابعة

اشراف :د. علاء جبار عبد

المقدمة:

حامض الستريك من الحوامض العضوية المهمة وهو حامض ثلاثي الكاربوكسيل .ان حامض الستريك ينتج بشكل طبيعي من خلال المسارات الايضية التي تجري في الخلية الحية بدورة كربس (دورة الاحماض العضوية الثلاثية الكاربوكسيل) .له تطبيقات عديدة في الاغذية والصناعات الكيميائية والصيدلانية كمواد منكهة ومواد حافظة ومثبتة . كان المصدر الطبيعي لحامض الستريك هو ثمار الفاكهة مثل انواع الحمضيات المختلفة والمثرى والاناناس وغيرها حتى نهاية القرن التاسع عشر ثم اتجه الانسان للبحث عن مصادر بديلة بعد ذلك وخاصة بعد زيادة الطلب عليه . تم تطوير طريقة ناجحة لإنتاجه بوساطة الاحياء المجهرية عن طريق استخدام التخمرات الساكنة في البداية وبعد ذلك استخدمت طريقة التخمرات المغمورة . بدأت عملية انتاج الحامض بوساطة الاحياء المجهرية تتصدر طرق الانتاج الاخرى وفاقت الطرق الكيمياوية وكانت اول عملية انتاج حيوي له حوالي عام 1923 . ومنذ ذلك الحين والى يومنا هذا ينتج حامض الستريك تجارياً وبكميات كبيرة جداً وهذا الانتاج يتزايد يوم بعد يوم (*etal*.,2007 Papagianni) .

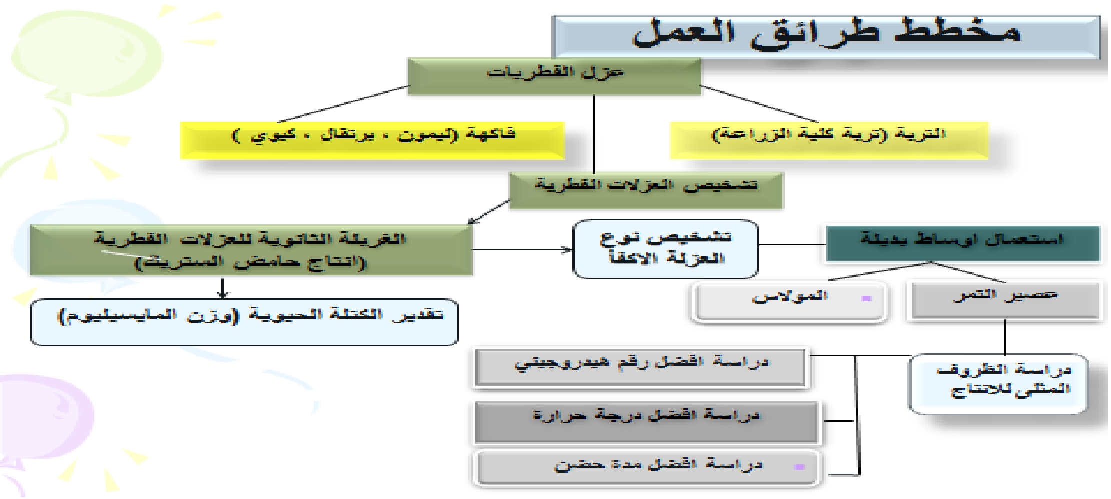
هناك العديد من الكائنات الحية المنتجة لحامض الستريك منها الفطريات ، الخمائر والبكتريا . وهناك نوعان من الجنس *Aspergillus* يستخدمان بصورة عامة في انتاج حامض الستريك هما : *A.wentii* و *A.niger* .

هناك سلالات عديدة من الفطر *A.niger* تستعملها المصانع التجارية لانتاج حامض الستريك حيث يحتفظ كل مصنع بسر نوع السلالة المستخدمة وكذلك بالتحسينات التي يجريها خلال مراحل الانتاج . والميزات الرئيسية لاستخدام هذا الكائن هو سهولة الحصول عليه وقابليته على تخمير كمية كبيرة من المواد الخام الرخيصة كما انه يعطي انتاجاً عالياً . وتختلف السلالات فيما بينهما في كفاءتها الانتاجية ويعتمد تحسين انتاج حامض الستريك في وسط النمو واستخدام سلالات اكثر كفاءة لانتاج هذا الحامض (Kamthane ,2017).

الهدف من المشروع

ان هدف هذا البحث الاستمرار في الحصول على عزلات جديدة من البيئة المحلية تمتلك قابلية لانتاج حامض الستريك فضلاً عن امكانية تحسين الوسط الغذائي بالتعرف على الظروف الفسيولوجية المثالية للحصول على اقصى انتاجية من حامض الستريك وباستعمال اوساط محلية رخيصة وبديلة عن التجارية ذات الكلفة العالية.

المواد وطرائق العمل :



سوف تشمل طرائق العمل ثلاث خطوات رئيسية للمشروع وكما مبين في المخطط اعلاه وهي كالاتي:

الخطوة الاولى : عزل الفطريات من مصادر مختلفة ويمكن تقسيمها الى :

1-**التربة** : تربة زراعية (تربة كلية الزراعة): بطريقة التخفيف باخذ اغرام في 9 مل ماء مقطر .

2-**الفاكهة** : الليمون ، البرتقال ، الكيوي : رطبت الفاكهة وتركت للتلوث او جمعت فاكهة ملوثة من السوق المحلي ونقلت للمختبر واخذ بواسطة اللوب الى طبق حاوي على وسط دكستروز البطاطا

حساب النسبة المئوية للتردد:

النسبة المئوية للتردد= عدد عزلات الفطر / عدد العزلات الكلية لجميع الفطريات X 100

الاوساط الزراعية المستعملة : استعمال وسط دكستروز البطاطا Potato – dextros agar والذي استعمل في عمليات عزل الفطريات ووسط زابك دوكس اكار Czapek Dox agar والذي استعمل كوسط لانتاج حامض الستريك.

الخطوة الثانية : تشخيص العزلات

استعمل المجهر الضوئي في تشخيص الفطريات استناداً إلى الصفات المظهرية للمستعمرات على وسط PDA، وشخصت العزلات على مستوى الجنس (Genus) وفقاً للمفاتيح التصنيفية المذكورة في(1980 (Mcginnis و Pitt and Hocking (1997) .

الخطوة الثالثة : اجراء الغربلة الثانوية باستعمال وسط انتاج حامض الستريك لاختيار العزلة الاكفأ وبطريقة تخمرات الحالة السائلة:

1- وسط قياسي مكون من 30 غرام سكروز ، 2.5 غرام $(NH_4)_2\ CO_3$ ،2.5 غرام KH_2PO_4 ، 2.5 غرام $MgSO_4 .7H_2O$ غرام لكل لتر ، استعمل فلاسك حجم 250مل ووضع فيه 50مل من الوسط المذكور ولقح مع 0.5مل من معلق السبوري والحضن بدرجة 30م لمدة 7 ايام.

2- اوساط بديلة بعد اختيار العزلة الاكفا في انتاج حامض الستريك والاوساط مكون من :

أ-**استعمال وسط عصير التمر** والذي يحضر من اخذ 1 كغم من التمر لكل 3 لتر ماء وعملية الاستخلاص تتم عند حرارة 60-70 م بجهاز خلاط ولمدة نصف ساعة الى 45 دقيقة وتجري عملية ترشيح ثم يوزع العصير في الفلاسكات .

ب- المولاس: تم الحصول عليه من معمل قصب السكر في محافظة ميسان وتم تحضيرة من خلال تخفيفه بالماء المقطر (بنسبة 1:1) وعدل له الرقم الهيدروجيني الى 4 وسخن بالحمام المائي لمدة 1 ساعة عند درجة 90م بعدها ترك ليله كاملة لترسيب المواد الغير مرغوبة ، اخذ الراشح واستعمل غي الدراسة الحالية. (Khattab etal.,,2017).

بعد اختيار الوسط البديل والمتمثل بعصير التمر درسة الظروف المثلى للانتاج وهي :

1- رقم هيدروجيني (2، 3، 4، 5، 6، 7)

2- درجة الحرارة المثلى (20، 25، 30، 35، 40) م (Khattab etal.,,2017)

3- مدة تحضين (3, 4, 5, 6, 7) يوم

واستخلص الحامض المتبقي ورشح المستخلص بوساطة ورق الترشيح وركز بالتبخير الى ثلث الحجم في فرن وبدرجة حرارة (60 مْ) ومن ثم اجريت عليه الفحوصات المختبرية اللازمة .

تقدير الاس الهيدروجيني :

استخدم الاس الهيدروجينيpH meter ايراني الصنع من النوع الرقمي.

تقدير الحموضة (مقدرة كحامض ستريك):

قدرت الحموضة حسب طريقة Pearson (1973) اذ اخذ (5 مل) من راشح الوسط المتخمر وسحح مع قاعدة هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز (0.1 عياري) وبوجود دليل الفينولفثالين وحسبت الحموضة الكلية وفقاً للمعادلة التالية :

الحموضة الكلية% (حامض الستريك)= العيارية x حجم القاعدةx الوزن المكافئ للحامض(0.064) x 100
حجم العينه (مل)

تقدير وزن المايسيليوم الجاف :

عين الوزن الجاف للمايسليوم حسب الطريقة التي اوردها الخاتنة (2002) مع بعض التحوير ، فبعد ترشيح الوسط المتخمر على اوراق ترشيح نوع (Whatman NO.1 معلومة الوزن وعند انتهاء عملية الترشيح جففت الورقة مع ما تحتويه من كتله حيوية ووسط داعم على (60-62 مْ) بوساطة فرن لحين ثبوت وزنها ثم اخذ وزنها باستخدام ميزان رقمي حساس وحسب الفرق بين الوزنين .

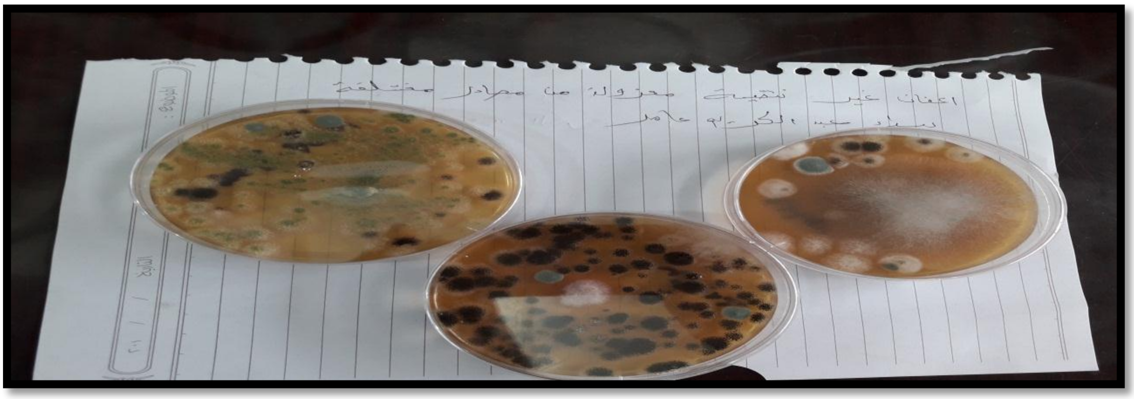
النتائج والمناقشة

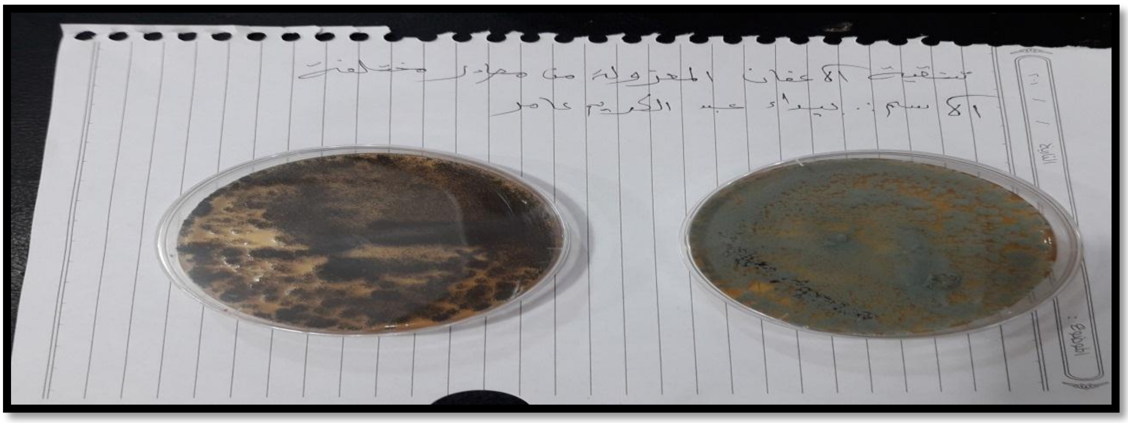
العزل والغربلة

تعد عملية عزل وانتخاب الكائن المجهري في مثل هذا النمط من الدراسات مفصلاً رئيساً تنبثق منه وعلى ضوئه المفاصل الأخرى للدراسة أذ امكن الحصول في هذه الدراسة على 9 عزلة نقية من الاعفان تعود الى 4 اجناس والمبينه في جدول(1) وشكل (1) وذلك من خلال اعتماد الحمضيات كمصادرعزل رئيسية غنية بحامض الستريك فضلاً عن استعمال التربة والتي تمثل المخزن المتنوع الطبيعي للأحياء المجهرية مع التركيز تحديداً على الأعفان.

جدول (1) اجناس العزلات واعدادها المعزولة من الحمضيات والتربة

جنس العزلات	النسبة المئوية لتردد الفطر %	عددها
Aspergillus sp.	55.5	5
Penicillium sp.	22.2	2
Alternaria sp.	11	1
Fusarium sp	11	1





شكل(1) بعض عزلات الاعفان قبل وبعد التنقية والمعزولة من مصادر مختلفة

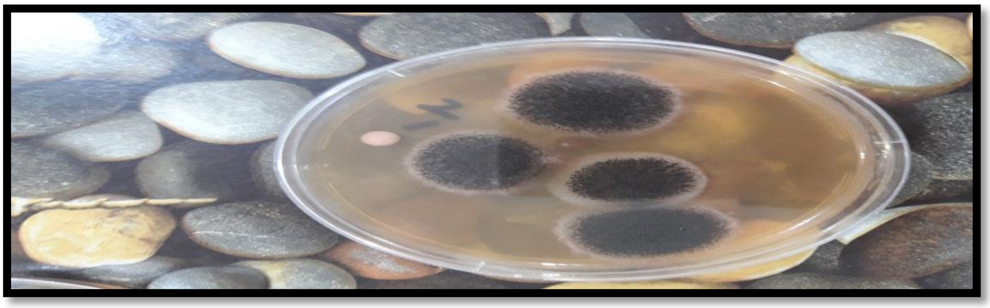
اذ يلاحظ من الجدول سيادة جنس *Aspergillus* و *Penicillium* من بين الاعفان المعزولة وبنسبة 55.5 % و 22.2 % على التوالي من مجموع العزلات وهذا جاء متوافقا مع ما ذكره احمد والنواوي(1999) إلى شيوع وانتشار هذين الجنسين في الطبيعة.

تباينت مصادر العزل المعتمدة للحصول على الاحياء المجهرية المنتجة لحامض الستريك بهدف الحصول على اعلى انتاجية للحامض ، الا ان اغلب الدراسات اشارت الى نجاح عملية العزل من التربة والحمضيات (Khattab *et al*.,2017) .

ان الغربلة الكمية للعزلات الفطرية (Quantitative Screening) تمثل اختبار تأكيدي لقابلية العزلات في انتاج مركبات معينة وتحديد قدرتها في التطبيق الصناعي بهدف كسب المعرفة المطلوبة عن الأحياء المجهرية المعزولة من الخطوة التي سبقتها، (ساجدي ومحمدعلي،1987). أجريت الغربلة الكمية للعزلات الوارد ذكرها في الجدول (2). ويلاحظ من النتائج المبينه في جدول (3) ان هناك تفاوتاً كبيراً بين العزلات فيما يتعلق بانتاج الحامض اذ تراوحت بين 0.75 – 1.71 غم /100 مل وسط وهذا قد يعزى الى وجود تباين وراثي فيما بينها ، وكان أفضل العزلات هي *Aspergillus sp.* B2 من حيث الحموضة الكلية ، اجريت عملية تشخيص لنوع العزلة الفطرية وتبين انها *Aspergillus niger* وكما مبينه في شكل (2) وهذا يتفق مع العديد من الدراسات التي اشارت الى ان افضل انواع الاعفان انتاجا لحامض الستريك هو عفن *Aspergillus niger*، (Shankar, and Sivakumar, 2016;Khattab *et al*.,2017)

جدول (2) الغربلة الثانوية (الكمية) لعزلات الاعفان المحلية المنتجة لحامض الستريك بأستعمال تقنية تخمرات الحالة السائلة

العزلة	وزن المايسيليوم الجاف (غم/ 100 مل)	حامض الستريك غم/ 100مل
***Aspergillus* sp. B1**	1.33	1.21
***Aspergillus* sp. B2**	1.88	1.71
***Aspergillus* sp. B3**	1.47	1.32
***Aspergillus* sp. B4**	0.87	0.75
***Aspergillus* sp. B5**	1.02	1.11
***Penicillium* sp. B6**	1.48	0.93
***Penicillium* sp. B7**	1.54	1.35
***Alternaria* sp. B8**	1.20	0.97
***Fusarium* sp. B9**	1.38	1.24



شكل (2) عزلة ***Aspergillus* sp. B2** والتي كانت الاكفأ في انتاج حامض الستريك

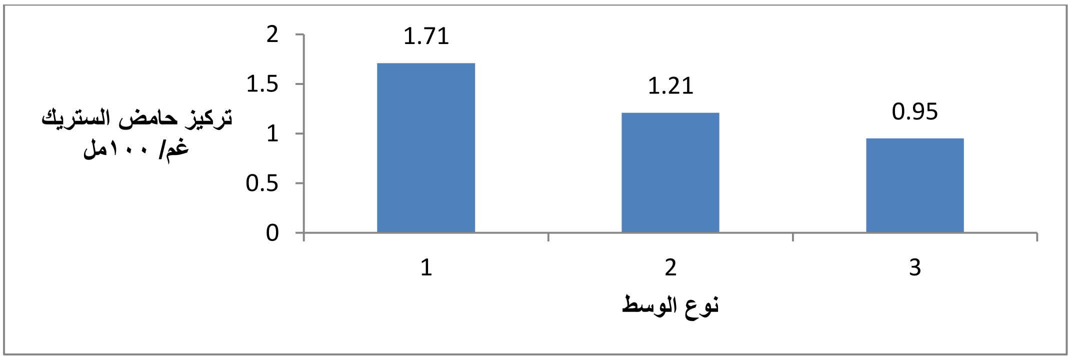
تحديد الظروف المثلى لإنتاج الحامض من عفن ***Aspergillus niger*B2**

أجريت دراسة لمعايير معينة للوقوف على أمثلها وتأثير ذلك في إنتاج الحامض بطريقة تخمرات الحالة السائلة، ومن هذه المعايير:

نوع الوسط

بهدف التوصل إلى افضل وسط غذائي لإنتاج الحامض ، اُختبرت بعض المصادر الطبيعية والمخلفات الصناعية في وسط التخمر العام بدلاً من السكروز النقي وذلك لما تحتويه هذه المصادر من مغذيات والتي تؤدي بدورها إلى اختزال كلف الانتاج ، إذ استعمل المولاس وعصير التمر كلٌ على حده في وسط التخمر العام كما في الشكل(1) اذ لوحظ تفوق معاملة عصير التمر على معاملة المولاس في انتاج الحامض من عفن *Aspergillus niger* استناداً إلى الحموضة الكلية اذ بلغت 1.21 غم/100 مل وسط في حين كانت الاقل عند استعمال المولاس اذ بلغت الحموضة الكلية 0.92 غم / 100مل وهذا قد يعود الى طبيعة مكونات كل وسط، اذ اكملت الدراسة الحالية باستعمال عصير التمر بديلا عن وسط زابك دوكس القياسي.

أذ ان استعمال هذه المصادر الطبيعية يحقق هدفاً آخر لا يقل أهمية عن الأهداف الأخرى التي مر ذكرها الا وهو الاسهام في تخليص البيئة من المخلفات الصناعية والزراعية (Khattab *etal*.,2017).



1:زابك القياسي، **2**: عصير التمر ، **3**: المولاس

شكل(**1**) تأثير نوع الوسط في انتاج الحامض من العزلة المحلية لعفن ***Aspergillus niger***

الرقم الهيدروجيني

لوحظ من جدول (3)ان هنالك تذبذباً في انتاج الحامض من خلال ارتفاع وانخفاض في الحموضة الكلية ضمن المدى بين(2-7) ولكن كان هناك ارتفاع متميز عند الرقم الهيدروجيني 4 والذي بلغت قيمته 1.58 غم/ 100 مل.

جدول(3) الرقم الهيدروجيني في انتاج حامض الستريك من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus niger*

الرقم الهيدروجيني	قيمة حامض الستريك غم/ 100 مل
2	1
3	1.46
4	1.58
5	1.3
6	1.02
7	0.91

ان هذه النتائج كانت مقاربة لماذكره El-Hussein *et al.*(2009) في ان أفضل انتاج لحامض الستريك من عفن *Aspergillus niger* عند الرقم الهيدروجيني 3.5 اما Khattab et al.,(2017) فقد لاحظ ان اقصى انتاجية كانت عند رقم هيدروجيني 5.

ان دور الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط الانتاجي للحامض يعود الى تأثيرة في ذائبية مكونات الوسط الغذائية وجاهزية هذه المكونات للعفن فضلا عن تأثيره في تأين وثباتية المركبات الحيوية الناتجة خلال عملية التخمير (Bull and Bushnell, 1976) اذ يؤثر الرقم الهيدروجيني تأثيراً مباشراً في التمثيل الغذائي للفطر (أحمد والنواوي، 1999).

درجة الحرارة

تؤثر درجة الحرارة في تحديد نشاط الأحياء المجهرية المختلفة ومنها الفطريات الخيطية وخصوصاً النمو والفعاليات الحيوية للأحياء وبهذا فهي تعد وسيلة أساسية للسيطرة على كل من فعاليات البناء الحيوي والهدم لهذه الأحياء ، ولاسيما في الصناعات التخمرية (Anderson and Smith,1976). يتضح من جدول(4) ان أعلى انتاج للحامض كان عند درجة حرارة 30 م ، إذ بلغت 1.60 غم/100مل ، ومما تجدر الاشارة اليه ان كثافة النمو الملاحظة قد انخفضت هي الأخرى ويمكن الاستنتاج بان درجة حرارة 30 م تمثل الحد الأقصى لنمو عفن *Aspergillus niger* ضمن الظروف المحددة، وقد ذكر Anderson and Smith (1976) ان درجة الحرارة تتداخل مع العوامل البيئية الأخرى ، وتتغير الاحتياجات التغذوية لبعض الأحياء المجهرية خلال النمو عند درجات الحرارة فوق المثلى.

اتفقت هذه النتائج مع ماتوصل اليه كل من El-Hussein *et al.*(2009) و Khattab *et al.*,(2017) لإنتاج الحامض اذ وجدوا ان افضل درجة حرارة هي 30 م.

جدول (4) تأثير درجة الحرارة في انتاج حامض الستريك من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus niger*

درجة الحرارة	قيمة حامض الستريك غم/ 100 مل
20	1.12
25	1.32
30	1.60
35	1.41
40	0.91

مدة الحضن المثلى

تم تعيين مدة الحضن المثلى لانتاج الحامض من العفن قيد الدراسة، اذ لوحظ من جدول(5) زيادة انتاجية الانزيم بتقادم مدة الحضن وبلوغها الحد الاقصى وهي 1.72 غم / 100 مل بعد 7 ايام ، عادت بعدها الحموضة الكلية الى الانخفاض في وسط الانتاج بعد 7 ايام من الحضن.

جدول(5) تأثير مدة الحضن المثلى في انتاج حامض الستريك من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus niger*

مدة الحضن	قيمة حامض الستريك غم/ 100 مل
3	0.88
4	1.32
5	1.43
6	1.61
7	1.72

اتفقت النتائج المذكورة مع العديد من الدراسات التي اكدت على ان انتاج الحامض من الاعفان استغرق 5-7 ايام ، اذ ذكركل من Macris and Markakis (1981) ان انتاج الانزيم من عفن *Fusarium moniliforme* في وسط نخالة الحنطة يزداد تدريجا" مع تقدم مدة الحضن حتى يبلغ اقصاه بعد مرور 140 – 160 ساعة من زمن التخمير.

المصادر

– دلالي،باسم كامل و الحكيم ،صادق حسن(1987).تحليل الاغذية . جامعة الموصل.

–الختاتنة،احمد عطا خليل(2002).انتاج حامض الستريك من العزلات الفطرية المحلية ومتطفراتها ودراسة الظروف المزرعية المثلى للانتاج.رسالة ماجستير،كلية الزراعة،جامعة البصرة.

-El-Hussein, A. A. ; Tawfig,S.M.; Shaza G. Mohammed, Marmar A. El Siddig and Mohammed A. M. Siddig(2009).Citric Acid Production from Kenana Cane Molasses by *Aspergillus niger* in Submerged Fermentation .JGEB:7(2):51-57.

- Kamthane, D.C.(2017).Citric acid production by *Aspergillus niger* and Aspergillus flavus isolated from soybean rhizospheric soil. Bioscience Discovery, 8(2): 261-264.

- **Khattab, A. A.; Salem A.A, and E Soheam,A.** (2017).Optimization of Citric Acid Production by Aspergillus niger isolated from different Habitats. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences,8(6):614-623.

- Marier, J. R. and Boulet, M. (1958). Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method. J. Dairy Sci., 41: 1683-1692.

- **Mcginnis , M.R. (1980).** Laboratory handbook of medical mycology. Academic Press, Inc., New york, 587p .

-Papagianni ,M.(2007).Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. Biotechnology Advances 25:244–263.

-Pearson, D. (1973). The chemical anylases of foods. 6th ed. Chemical publishing Co., Inc., London.

-Pitt, J.I. and Hocking , A.D. (1997). Fungi and food spoilage. Blackie Academic Professional. New York , 519 p .

-Shankar,T. and Sivakumar,T. (2016).Screening of Citric Acid Producing Fungi from the Leaf Litter Soil of Sathuragiri. Hills Bioengineering and Bioscience 4(4): 56-63.